

CITATION 4

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-267995

(43) 公開日 平成7年(1995)10月17日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 14/65		8318-4H		
1/18		8318-4H		
// A 6 1 K 38/27	A B J			
			A 6 1 K 37/ 36	A B J
				A D F
	審査請求	未請求	請求項の数 5	F D (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平6-85333	(71) 出願人	000006699 雪印乳業株式会社 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号
(22) 出願日	平成6年(1994)3月31日	(72) 発明者	加藤 健 埼玉県川越市新宿町5-11-3
		(72) 発明者	松山 博昭 埼玉県川越市新宿町5-11-3
		(72) 発明者	高田 幸宏 埼玉県川越市小堤62-22
		(72) 発明者	川崎 功博 埼玉県川越市笠幡4881-21
		(72) 発明者	内田 俊昭 埼玉県川越市新宿町5-11-3
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウシインスリン様増殖因子-1含有組成物の製造法

(57) 【要約】

【目的】 牛乳または牛乳由来の原料からウシインスリン様増殖因子-1含有組成物を効率的に製造する方法を提供する。

【構成】 牛乳または牛乳由来の原料を陽イオン交換体と接触させて、ウシインスリン様増殖因子-1を吸着させた後、溶出して回収する。さらには、脱塩・濃縮してウシインスリン様増殖因子-1含有組成物を得る。

【効果】 ウシインスリン様増殖因子-1は骨強化作用を有することから、このウシインスリン様増殖因子-1を高度に含有する組成物は、各種の骨関節疾患、特に骨粗鬆症の予防あるいは治療効果を賦与する飲食品、医薬、飼料などの素材として有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 牛乳または牛乳由来の原料を陽イオン交換体と接触させて、ウシインスリン様増殖因子-1を吸着させた後、溶出して回収することを特徴とするウシインスリン様増殖因子-1含有組成物の製造法。

【請求項2】 溶出に用いる溶出液の塩濃度が0.1M以上、0.3M以下であり、pHが5.6以上8未満である請求項1記載の製造法。

【請求項3】 予め加熱した牛乳または牛乳由来の原料を用いる請求項1または2記載の製造法。

【請求項4】 陽イオン交換体がスルホン酸基を交換基として持つ強酸性陽イオン交換体である請求項1〜3いずれかに記載の製造法。

【請求項5】 ウシインスリン様増殖因子-1を含有する溶出液を、さらに分画分子量10kDa以下の限外濾過膜で脱塩、濃縮する請求項1〜4いずれかに記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、インスリン様増殖因子-1含有組成物の製造法に関する。このインスリン様増殖因子-1含有組成物は、骨強化作用を有し、骨粗鬆症の予防や治療に有用である。

【0002】

【従来の技術】近年、高齢化に伴い骨粗鬆症、骨折、腰痛などの各種骨疾患患者が増加している。これは、カルシウムの摂取不足、カルシウム吸収能力の低下、閉経後のホルモンアンバランスなどが原因であるとされている。このような高齢化に伴う骨粗鬆症や骨折などの各種骨疾患を予防するためには、骨量をできるだけ増加させて最大骨量（peak bonemass）を高めることが有効であるとされている。そして、最大骨量を高めるといことは、まさしく骨を強化することに他ならない。

【0003】このような現状の中、カルシウムの補給を目的として、炭酸カルシウム、乳酸カルシウム、磷酸カルシウムなどのカルシウム塩や牛骨粉、卵殻、魚骨粉などの天然のカルシウム剤が用いられている。しかし、これらのカルシウムの中には、消化管内で不溶性の塩を形成し、体内に十分吸収されないものもある。また、骨粗鬆症治療や骨強化のための医薬として、ビタミンD₃やカルシトニン製剤などが用いられているが、これらの医薬を用いた場合、耳鳴り、頭痛、食欲不振などの副作用を伴うことがある。したがって、骨粗鬆症という疾病の性質上、長期的に経口摂取することができ、その予防または治療効果を期待できるような食品の開発が望まれている。

【0004】一方、インスリン様増殖因子-1（以下、IGF-1と略記する）は、ソマトメジンのクラスに属する分子量約7,800のポリペプチドであり、骨芽細

胞を活性化し、骨量を増加させて骨を強化するなど骨代謝において重要な役割を果たす因子であることが知られている。また、最近になって消化管にIGF-1のレセプターが存在することが明らかになり、経口摂取されたIGF-1が消化管のレセプターを介して作用することが示唆されている〔ホルモンと臨床、第39巻、31〜37頁、1991年〕。そして、このIGF-1については、ヒト乳中に存在することが確認されており〔J. Clin. Endocrinol. Metab., 第58巻、955〜959頁、1984年〕、それ以外にも血清や肝臓を含む全ての臓器に存在することが確認されている〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第81巻、935〜939頁、1984年〕。

【0005】また、このIGF-1を調製する方法としては、血清などから単離する方法〔J. Biol. Chem., 第261巻、569〜575頁、1986年〕や遺伝子組み換えによって生産する方法〔特開昭63-269984号公報〕などが知られている。しかし、骨粗鬆症の予防や治療を目的として食品中にIGF-1を添加することを考えると、血清から単離したものや遺伝子組み換えて生産したものは、コストや安全性などの点で問題がある。

【0006】ところで、牛乳中にもIGF-1が存在することが確認されており、ウシIGF-1の化学構造はヒトIGF-1と全く同一であると報告されている〔Biochem. J., 第251巻、95〜103頁、1988年〕。これはウシIGF-1がヒトインスリン様増殖因子-1と同じ作用をもつことを示すものであり、牛乳中に存在するウシIGF-1であれば、食品中に添加しても安全上全く問題がないといえる。

【0007】なお、牛乳中からウシIGF-1を調製する方法としては、ウシ初乳を酸抽出した後、陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相HPLCなどを組み合わせて処理する方法が知られている〔Biochem. J., 第233巻、207〜213頁、1986年〕。しかし、實際上、この方法は工程が煩雑であり、特に、ウシ初乳の酸抽出を行うことにより乳蛋白質の大部分が酸沈澱し、この酸沈澱した乳蛋白質を有効に利用することができないので、工業的に好ましい方法とは言えない。また、ウシIGF-1のN末端5残基が欠如したペプチドを牛乳中から単離する方法が知られている〔特表昭63-501567号公報〕。しかし、この方法も酸沈澱と陽イオン交換クロマトグラフィーなどによるものであり、同様に工業的に好ましい方法とは言えない。

【0008】先に、本発明者らは、牛乳または牛乳由来の原料を加熱処理することにより、IGF-1を含有する組成物を調製する方法について提案した〔特願平5-97273号〕。しかしながら、このIGF-1含有組成物のIGF-1含量は10〜25μg/g程度であ

10

20

30

40

50

り、より IGF-1 含量の高い組成物を調製する方法の開発が望まれている。また、この方法においても、加熱によって沈澱する乳蛋白質を有効に利用することができないという問題もあった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、上述の問題点を鑑み、牛乳または牛乳由来の原料からウシ IGF-1 を分離する方法について、鋭意研究を進めたところ、陽イオン交換体を用いることにより、ウシ IGF-1 含量の高い組成物が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。したがって、本発明は、ヒト IGF-1 と同一の化学構造を持ち、骨強化作用や骨粗鬆症の予防や治療に有用であるウシ IGF-1 を高度に含有する組成物を牛乳から効率良く分離する方法を提供することを課題とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明では、ウシ IGF-1 を高度に含有する組成物を製造するに際して、牛乳または牛乳由来の原料を陽イオン交換体と接触させてウシ IGF-1 画分を吸着させた後、その画分を適当な溶出液で溶出し、回収する。

【0011】本発明で用いる牛乳または牛乳由来の原料とは、例えば、脱脂乳、チーズホエー、酸ホエー、初乳などであり、その他に、ホエー蛋白質濃縮物(WPC)、ホエー蛋白質単離物(WPI)、全粉乳、脱脂粉乳、ホエー粉などを還元したものでも構わない。また、陽イオン交換体と接触させる前に、これらの原料を予め加熱しておくことと良い。すなわち、原料を加熱して乳中に存在するカゼイン、 α -ラクトアルブミン、 β -ラクトグロブリンなどの主要な乳蛋白質を変性させることにより、陽イオン交換体に吸着する不純物の量を減少させることができる。その結果、組成物中のウシ IGF-1 含量を向上することになる。この加熱処理を行わなくてもウシ IGF-1 は十分回収できるが、カゼインやホエー蛋白質の混入が多くなり、結果的に組成物中の IGF-1 含量を低下させる。なお、この加熱処理を行うに際しては、次の式に従って加熱温度を設定すれば良い。

【0012】 $T \geq -5(pH) + 100$

(但し、Tは摂氏温度を表し、pHは $2 \leq pH \leq 7$ である。)

【0013】陽イオン交換体と接触させる原料の pH については特に限定は無いが、pH が低すぎると夾雑する乳蛋白質の多くが陽イオン交換体に吸着するため、結果的に組成物中のウシ IGF-1 含量が低下する。逆に pH が高すぎるとウシ IGF-1 の陽イオン交換体への吸着量が減少するので好ましくない。したがって、通常の牛乳の pH と同程度の中性域で陽イオン交換処理を行うと良い。

【0014】また、陽イオン交換体と接触させる原料の塩濃度についても特に限定は無いが、通常行われるイオ

ン交換処理と同様、原料の塩濃度が高いと陽イオン交換体への吸着が悪くなり、原料からのウシ IGF-1 回収率が低下する。したがって、通常の牛乳と同程度の塩濃度か、それ以下に調整しておくことが好ましい。

【0015】さらに、牛乳または牛乳由来の原料を陽イオン交換体と接触させる際には、予めクラリファイヤーなどで処理を行い、原料中に含まれる微細な沈澱などを除去しておくことが好ましい。

【0016】本発明では、牛乳または牛乳由来の原料と陽イオン交換体とを接触させる方法について特に制限はなく、従来より行われている充填層型カラムを用いる方法、回転型カラムを用いる方法、あるいはバッチ法などの方法に従って陽イオン交換を行うことができる。また、牛乳または牛乳由来の原料と陽イオン交換体との接触時間についても特に制限は無く、長時間接触させる方が良いが、余り長時間接触させると原料が劣化するので、接触時間は 10 分～24 時間とすることが望ましい。さらに、陽イオン交換体と接触させる原料の温度についても特に制限はないが、 $4^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$ が望ましい。温度が 40°C 以上となると原料の劣化が著しくなる。

【0017】本発明では、陽イオン交換体と原料との割合を、陽イオン交換体/原料 = $1/10(w/w) \sim 1/3,000(w/w)$ 、好ましくは、陽イオン交換体/原料 = $1/16(w/w) \sim 1/1,000(w/w)$ とする。陽イオン交換体/原料の値が $1/10(w/w)$ より大きくなると陽イオン交換体のコストが相対的に高くなる。また、陽イオン交換体/原料の値が $1/3,000$ より小さくなるとウシ IGF-1 の回収率が極端に悪くなる。

【0018】本発明で用いることのできる陽イオン交換体としては、カルボキシメチル基を交換基として持つ CM-セルロース、CM-セルロース、マイクロブレップ CM ストロングカチオンエクスチェンジサポート、CM-セファロース、CM-セファデックス、C-スフェロシルなどやスルホン酸基を交換基として持つスルホン化キトバル、SP-トローヨバル、S-セファロース、SP-セファデックス、インディオ S3、S-スフェロシル、マイクロブレップ S ストロングカチオンエクスチェンジサポートなどを例示することができるが、ウシ IGF-1 含量のより高い組成物を得るためには、スルホン酸基を交換基として持つ強酸性陽イオン交換体を用いることが望ましい。

【0019】本発明では、牛乳または牛乳由来の原料と陽イオン交換体とを接触させて、陽イオン交換体にウシ IGF-1 を吸着させた後、まず、0.1M 未満の塩濃度の溶液または脱イオン水などで陽イオン交換体を洗浄する。この洗浄を行うと夾雑する乳蛋白質の一部を陽イオン交換体から除去することができ、結果的に組成物中のウシ IGF-1 含量を向上させることができるので、この処理を行うことが好ましい。その後、陽イオン交換

体からウシIGF-1を溶出する。この溶出方法についても、通常行われている溶出方法に従って行えば良いが、溶出に用いる溶出液の塩濃度は0.1M~0.3Mの範囲のものを用いる必要がある。溶出液の塩濃度が0.1M未満であると陽イオン交換体からのウシIGF-1の溶出が十分行えない。また、溶出液の塩濃度が0.3Mを超えると陽イオン交換体に吸着したウシIGF-1以外の蛋白質をも一緒に溶出させることになり、結果的に組成物中のウシIGF-1含量を低下させる。

【0020】なお、この溶出液のpHについては5以上8未満が良好であることを実験により得ており、したがって、溶出液としては、トリス-塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、炭酸緩衝液など、通常用いられている緩衝液に、塩化ナトリウム、塩化カリウム、酢酸アンモニウムなどの中性の塩を溶解したものを用いると良い。また、溶出液として、塩濃度が0.1M以上0.3M以下で緩衝能を持たない中性の塩溶液を用いることもでき、操作性の向上やコストの低減という意味では好ましい。

【0021】次に、このようにして得られたウシIGF-1画分を含む溶出液については、通常行われている方法、例えば、イオン交換樹脂、逆浸透膜、限外濾過膜、透析膜、電気透析膜、ゲル濾過担体などを用いる方法により、あるいは、これらの方法を組み合わせた方法により、脱塩および濃縮を行うことができるが、脱塩および濃縮の方法としては、限外濾過およびダイヤフィルトレーションを組み合わせた方法が、濃縮と脱塩を同時に行えるので好ましい。なお、この際に用いることのできる限外濾過膜は、分画分子量が10kDa以下のものであればどのような限外濾過膜でも良い。このウシIGF-1含有組成物濃縮液をそのまま用いることもできるが、必要に応じて、噴霧乾燥や凍結乾燥などの方法によりウシIGF-1含有組成物の乾燥粉末を得ることもできる。さらに、ウシIGF-1は比較的熱に安定な性質を有するので、通常行われているような加熱殺菌の工程を加えることも可能である。

【0022】本発明の方法で得られたウシIGF-1含有組成物中のウシIGF-1含量を抗IGF-1抗体を用いた免疫学的測定法により測定したところ、原料からのIGF-1の回収率は平均40%程度であった。なお、初乳から酸抽出と陽イオン交換クロマトグラフィーを組み合わせて回収したウシIGF-1の回収率は、文献[Biochem. J., 第233巻, 207~213頁, 1986年]によると25%であり、本発明の方法はそれを上回るものであった。

【0023】また、本発明の方法によれば、陽イオン交換体に吸着しなかった乳成分を再利用することが可能であり、工程も煩雑でないので、酸抽出と陽イオン交換クロマトグラフィーを組み合わせた方法よりも実用的である。

【0024】なお、このウシIGF-1含有組成物中に

は、カゼインやホエー蛋白質などの成分が含まれており、特に、ラクトフェリン、ラクトパーオキシダーゼ、セクレタリーコンポーネントなどの蛋白質が生理活性を有するが、これらの蛋白質は、ウシIGF-1の生理作用に何ら影響を与えるものではないので、これらの蛋白質が含まれていても実質的な問題はないが、不都合がある場合は、加熱などの処理によりこれらの蛋白質を失活させることもできる。また、ラクトパーオキシダーゼに関しては、再クロマトグラフィーなどの方法で分離するか、酸性状態にして失活させることも可能である。

【0025】本発明の方法によって得られたウシIGF-1含有組成物は、骨強化作用を有するので、飲食品、医薬、飼料などに添加し、骨粗鬆症の予防や治療などの効果を賦与することができる。また、このウシIGF-1含有組成物を含有する飲食品、医薬、飼料などに、塩化カルシウム、炭酸カルシウム、乳酸カルシウム、卵殻、あるいは乳由来のカルシウムなどの吸収性良好なカルシウムを添加することにより、これらの効果をさらに増すことが可能となる。なお、このウシIGF-1含有組成物については、ラットによる動物試験の結果、急性毒性は認められなかった。次に、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

【0026】

【実施例1】150℃、5秒間加熱殺菌したチーズホエー(pH6.0)50lを、脱イオン水で十分洗浄したスルホン化キトパール(富士紡績社製)500gを充填したカラムに、流速25ml/分で通液した。通液後、脱イオン水でスルホン化キトパールを十分洗浄した後、0.28M塩化ナトリウムを含む0.02M炭酸緩衝液(pH7.0)で吸着したウシIGF-1を溶出した。そして、この溶出液を分画分子重量10kDaの限外濾過膜で脱塩、濃縮した後、凍結乾燥して粉末状のウシIGF-1含有組成物450mgを得た。このウシIGF-1含有組成物中に含まれるウシIGF-1の含量をラジオイムノアッセイ(RIA)で測定したところ、160μg/gであることが判った。

【0027】

【実施例2】未殺菌の脱脂乳(pH6.5)1,000lを、脱イオン水で十分洗浄したSPトローパール(東ソー社製)1kgを充填したカラムに、流速30ml/分で通液した。通液後、脱イオン水でSPトローパールを十分洗浄した後、0.15M塩化ナトリウムを含む0.05M炭酸緩衝液(pH7.5)で吸着したウシIGF-1を溶出した。そして、この溶出液を分画分子重量8kDaの膜で限外濾過およびダイヤフィルトレーションを行って脱塩、濃縮した後、凍結乾燥して粉末状のIGF-1含有組成物50gを得た。このウシIGF-1含有組成物中に含まれるウシIGF-1の含量をラジオイムノアッセイ(RIA)で測定したところ、65μg/gであることが判った。

【0028】

【実施例3】10重量%濃度となるようホエー蛋白質濃縮物(WPC)を蒸留水で十分溶解してホエー蛋白質溶液(pH6.8)40lを調製した。このホエー蛋白質溶液を、脱イオン水で十分洗浄したCM-セルロフィン(生化学工業社製)400gを充填したカラムに、流速20ml/分で通液した。通液後、0.02M塩化ナトリウムを含む0.03Mリン酸緩衝液(pH7.4)でCM-セルロフィンを十分洗浄した後、0.20M塩化ナトリウムを含む0.10Mクエン酸緩衝液(pH6.2)で吸着したウシIGF-1を溶出した。そして、この溶出液を電気透析(ED)法により脱塩、濃縮した後、凍結乾燥して粉末状のウシIGF-1含有組成物1.3gを得た。このウシIGF-1含有組成物中に含まれるウシIGF-1の含量をラジオイムノアッセイ(RIA)で測定したところ、35μg/gであることが判った。

【0029】

【実施例4】10重量%濃度になるようホエー蛋白質単離物(WPI)を蒸留水で十分溶解してホエー蛋白質溶液(pH6.5)80lを調製した。このホエー蛋白質溶液を、脱イオン水で十分洗浄したSP-セファロース(ファルマシア社製)800gを充填したカラムに、流速24ml/分で通液した。通液後、0.01M塩化ナトリウムを含む0.05M炭酸緩衝液(pH7.6)でSP-セファロースを十分洗浄した後、0.10M塩化ナトリウムを含む0.20Mクエン酸緩衝液(pH5.7)で吸着したウシIGF-1を溶出した。そして、この溶出液をイオン交換クロマトグラフィーにより脱塩した後、噴霧乾燥して粉末状のウシIGF-1含有組成物29.6gを得た。このウシIGF-1含有組成物中に含まれるウシIGF-1の含量をラジオイムノアッセイ(RIA)で測定したところ、51.2μg/gであることが判った。

【0030】

【実施例5】121℃、30秒間加熱殺菌した酸カゼインホエー3tを、重炭酸ナトリウムでpH6.0に調整した後、脱イオン水で十分洗浄したSP-セファデックス(ファルマシア社製)30kgを充填したカラムに、流速10l/分で通液した。通液後、脱イオン水でSP-セファデックスを十分洗浄した後、0.25M塩化ナトリウムを含む0.05M炭酸緩衝液(pH7.0)で吸着したウシIGF-1を溶出した。そして、この溶出液を逆浸透(RO)膜で脱塩、濃縮した後、噴霧乾燥して粉末状のウシIGF-1含有組成物176gを得た。このウシIGF-1含有組成物中に含まれるウシIGF-1の含量をラジオイムノアッセイ(RIA)で測定したところ、106μg/gであることが判った。

【0031】

【実施例6】10重量%濃度になるようホエー蛋白質濃

縮物(WPC)を蒸留水で十分溶解してホエー蛋白質溶液(pH6.8)を調製した後、この溶液を90℃で10分間加熱し、17,000×Gで遠心分離して得られた上清10lを、脱イオン水で十分洗浄したインディオンS3(オルガノ社製)500gを充填したカラムに、流速18ml/分で通液した。通液後、0.07Mトリス-塩酸緩衝液でインディオンS3を十分洗浄した後、0.3M塩化ナトリウム溶液(pH7.3)で吸着したウシIGF-1を溶出した。そして、この溶出液をゲル濾過クロマトグラフィーで脱塩した後、凍結乾燥して粉末状のウシIGF-1含有組成物1.4gを得た。このウシIGF-1含有組成物中に含まれるウシIGF-1の含量をラジオイムノアッセイ(RIA)で測定したところ、42μg/gであることが判った。

【0032】

【実施例7】150℃、5秒間加熱殺菌した初乳(pH6.8)2lを、脱イオン水で十分洗浄したS-スフェロシル(IBF社製)100gを充填したカラムに、流速20ml/分で通液した。通液後、脱イオン水でS-スフェロシルを十分洗浄した後、0.3M塩化ナトリウム溶液(pH7.3)で吸着したウシIGF-1を溶出した。そして、この溶出液を分画分子量10kDaの膜で限外濾過およびダイヤフィルトレーションを行って脱塩、濃縮した後、凍結乾燥して粉末状のウシIGF-1含有組成物1.5gを得た。このウシIGF-1含有組成物中に含まれるウシIGF-1の含量をラジオイムノアッセイ(RIA)で測定したところ、184μg/gであることが判った。

【0033】

【実施例8】121℃、30秒間加熱殺菌した脱脂乳(pH6.5)100lを、脱イオン水で十分洗浄したマイクロレップSストロングカチオンエクスチェンジサポート(バイオラッド社製)0.5kgを充填したカラムに、流速35ml/分で通液した。通液後、0.05M炭酸緩衝液でマイクロレップSストロングカチオンエクスチェンジサポートを十分洗浄した後、0.20M塩化ナトリウムを含む0.10Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.4)で吸着したウシIGF-1を溶出した。そして、その溶出液を逆浸透(RO)膜で脱塩、濃縮した後、噴霧乾燥して粉末状のウシIGF-1含有組成物1.3gを得た。このウシIGF-1含有組成物中に含まれるウシIGF-1の含量をラジオイムノアッセイ(RIA)で測定したところ、114μg/gであることが判った。

【0034】

【実施例9】未殺菌のチーズホエー(pH6.5)20lを、脱イオン水で十分洗浄したC-スフェロシル(IBF社製)300gを充填したカラムに、流速25ml/分で通液した。通液後、脱イオン水でC-スフェロシルを十分洗浄し、さらに、0.07Mリン酸緩衝液(p

H7、2)で十分洗浄した後、0.25M塩化ナトリウムを含む0.05Mクエン酸緩衝液(pH6.5)で吸着したウシIGF-1を溶出した。そして、この溶出液をナノフィルトレーション膜で脱塩、濃縮した後、凍結乾燥して粉末状のウシIGF-1含有組成物890mgを得た。このウシIGF-1含有組成物中に含まれるウシIGF-1の含量をラジオイムノアッセイ(RIA)で測定したところ、43μg/gであることが判った。

【0035】

【試験例1】実施例1から9で得られたウシIGF-1含有組成物について、骨芽細胞増殖効果を調べた。培養骨芽細胞株(MC3T3-E1)を96穴の平底細胞培養プレートに撒き込み、0.3重量%ウシ血清を含むα-MEM培地(Flow Laboratories社製)で18時間培養した。なお、この培養に際しては、培地100μlに対して、ウシIGF-1含有組成物を0.5重量%濃度に溶解した溶液2μlを添加した。培養後、トリチウムでラベルしたチミジンを添加し、2時間後に細胞に取り込まれたチミジンの放射活性を測定することにより、骨芽細胞の増殖活性を求めた。その結果を図1に示す。なお、図1では、培地にウシIGF-1

* G F - 1 含有組成物を添加しなかった群の放射活性を100%とし、放射活性からウシIGF-1含有組成物を添加した群の細胞増殖活性を示した。これによると、実施例1から9で得られたウシIGF-1含有組成物を添加した群は、ウシIGF-1含有組成物を添加しなかった群と比べ、1.8~2.7倍の骨芽細胞の増殖活性を示した。

【0036】

【試験例2】実施例5で得られたウシIGF-1含有組成物について、動物実験により骨強化作用を調べた。実験動物は4週齢のSD系雌ラットを用い、1試験群7匹で行った。骨粗鬆症モデルラットを1週間予備飼育した後、卵巣摘出手術を施し、さらに、カルシウム欠乏食で5週間飼育して実験に供した。また、疑似手術のみを施し、卵巣を摘出しない sham ラットも実験に供した。そして、骨粗鬆症モデルラットを対照群(A群)、ウシIGF-1含有組成物投与群(B)およびウシIGF-1含有組成物+カルシウム投与群(C)の3群に分け、表1に示す被験飼料でそれぞれ3週間飼育した。

【0037】

【表1】

	(A) 群	(B) 群	(C) 群
蔗糖	51.05 (%)	51.46 (%)	50.62 (%)
カゼイン	20.0	18.0	18.0
コーンスターチ	15.0	15.0	15.0
セルロース	5.0	5.0	5.0
コーン油	5.0	5.0	5.0
ビタミン混合	1.0	1.0	1.0
ミネラル混合	2.65	2.43	3.27
D L - メチオニン	0.3	0.3	0.3
ウシIGF-1含有組成物	-	1.81	1.81

【0038】なお、カゼイン2重量%に相当する窒素量に置換して、ウシIGF-1含有組成物1.81重量%を添加した。また、飼料中のカルシウム量、リン量およびマグネシウム量については、飼料100g当たり、300mg、230mgおよび50mgとした。さらに、(C)群については、カルシウム量およびリン量を飼料100g当たり、520mgおよび400mgとした。

【0039】そして、3週間後に各群のラットの両側大腿骨を摘出し、破断特性装置で骨強度を測定した。その結果を図2に示す。これによると、大腿骨破断応力は、対照群(A)に比べてウシIGF-1含有組成物投与群(B)で統計学的に有意に高い値を示した。さらに、ウシIGF-1含有組成物+カルシウム投与群(C)は、ウシIGF-1含有組成物投与群(B)に比べて統計学的に有意に高い値を示した。

【0040】次に、本発明の方法で製造したウシIGF-1含有組成物を添加した飲食品について、参考例を示す。

【0041】

【参考例1】常法に従い、表2に示す組成のウシIGF-1含有組成物入り果汁飲料を製造した。

【0042】

【表2】

混合異性化糖	15.0 (重量%)
果汁	10.0
クエン酸	0.5

11

12

ウシIGF-1含有組成物	0.5
香料	0.1
カルシウム	0.1
水	73.5

【0043】

*【0044】

【参考例2】常法に従い、表3に示す組成のウシIGF-1含有組成物入りカルシウム剤を製造した。

【表3】

*

含水結晶ぶどう糖	73.5 (重量%)
ウシIGF-1含有組成物	20.0
カルシウム	5.0
シュガーエステル	1.0
香料	0.5

【0045】

【発明の効果】本発明の方法によると、牛乳または牛乳由来の原料からウシIGF-1を高度に含有するウシIGF-1組成物を提供することが可能となる。このウシIGF-1含有組成物は、骨強化作用を有することから、各種の骨関節疾患、特に骨粗鬆症の予防あるいは治療に有用である。また、ヒトの成長期にこのウシIGF-1組成物を摂取させることにより、最大骨量を増加させることができる。したがって、このウシIGF-1含※

※有組成物は、飲食品、医薬、飼料などの素材として有用である。

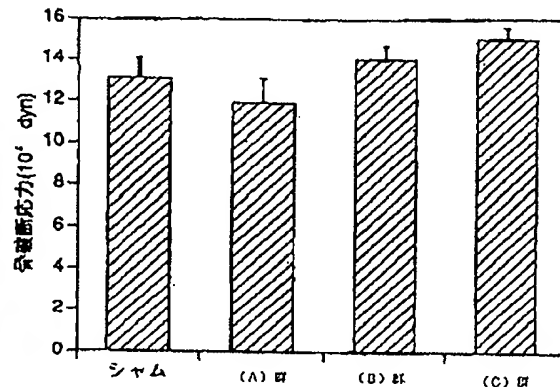
【図面の簡単な説明】

【図1】は、実施例1から9で得られたウシIGF-1含有組成物の骨芽細胞増殖促進効果について示したものである。

【図2】は、実施例5で得られたウシIGF-1含有組成物の骨強化作用について示したものである。

【図1】

【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

A61K 38/27

識別記号

ADF

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(72)発明者 八尋 政利

東京都東村山市久米川町2-8-13

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-267995

(43) 公開日 平成7年(1995)10月17日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 14/65		8318-4H		
1/18		8318-4H		
// A 6 1 K 38/27	A B J			

A 6 1 K 37/ 36

A B J

A D F

審査請求 未請求 請求項の数 5 F D (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-85333

(22) 出願日 平成6年(1994)3月31日

(71) 出願人 000006699

雪印乳業株式会社

北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

(72) 発明者 加藤 健

埼玉県川越市新宿町5-11-3

(72) 発明者 松山 博昭

埼玉県川越市新宿町5-11-3

(72) 発明者 高田 幸宏

埼玉県川越市小堤62-22

(72) 発明者 川崎 功博

埼玉県川越市笠幡4881-21

(72) 発明者 内田 俊昭

埼玉県川越市新宿町5-11-3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウシインスリン様増殖因子-1含有組成物の製造法

(57) 【要約】

【目的】 牛乳または牛乳由来の原料からウシインスリン様増殖因子-1含有組成物を効率的に製造する方法を提供する。

【構成】 牛乳または牛乳由来の原料を陽イオン交換体と接触させて、ウシインスリン様増殖因子-1を吸着させた後、溶出して回収する。さらには、脱塩・濃縮してウシインスリン様増殖因子-1含有組成物を得る。

【効果】 ウシインスリン様増殖因子-1は骨強化作用を有することから、このウシインスリン様増殖因子-1を高度に含有する組成物は、各種の骨関節疾患、特に骨粗鬆症の予防あるいは治療効果を賦与する飲食品、医薬、飼料などの素材として有用である。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 牛乳または牛乳由来の原料を陽イオン交換体と接触させて、ウシインスリン様増殖因子-1を吸着させた後、溶出して回収することを特徴とするウシインスリン様増殖因子-1含有組成物の製造法。

【請求項2】 溶出に用いる溶出液の塩濃度が0.1M以上、0.3M以下であり、pHが5.6以上8未満である請求項1記載の製造法。

【請求項3】 予め加熱した牛乳または牛乳由来の原料を用いる請求項1または2記載の製造法。

【請求項4】 陽イオン交換体がスルホン酸基を交換基として持つ強酸性陽イオン交換体である請求項1〜3いずれかに記載の製造法。

【請求項5】 ウシインスリン様増殖因子-1を含有する溶出液を、さらに分画分子量10kDa以下の限外濾過膜で脱塩、濃縮する請求項1〜4いずれかに記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、インスリン様増殖因子-1含有組成物の製造法に関する。このインスリン様増殖因子-1含有組成物は、骨強化作用を有し、骨粗鬆症の予防や治療に有用である。

【0002】

【従来の技術】近年、高齢化に伴い骨粗鬆症、骨折、腰痛などの各種骨疾患患者が増加している。これは、カルシウムの摂取不足、カルシウム吸収能力の低下、閉経後のホルモンアンバランスなどが原因であるとされている。このような高齢化に伴う骨粗鬆症や骨折などの各種骨疾患を予防するためには、骨量をできるだけ増加させて最大骨量（peak bonemass）を高めることが有効であるとされている。そして、最大骨量を高めるといことは、まさしく骨を強化することに他ならない。

【0003】このような現状の中、カルシウムの補給を目的として、炭酸カルシウム、乳酸カルシウム、磷酸カルシウムなどのカルシウム塩や牛骨粉、卵殻、魚骨粉などの天然のカルシウム剤が用いられている。しかし、これらのカルシウムの中には、消化管内で不溶性の塩を形成し、体内に十分吸収されないものもある。また、骨粗鬆症治療や骨強化のための医薬として、ビタミンD、やカルシトニン製剤などが用いられているが、これらの医薬を用いた場合、耳鳴り、頭痛、食欲不振などの副作用を伴うことがある。したがって、骨粗鬆症という疾病の性質上、長期的に経口摂取することができ、その予防または治療効果を期待できるような食品の開発が望まれている。

【0004】一方、インスリン様増殖因子-1（以下、IGF-1と略記する）は、ソマトメジンのクラスに属する分子量約7,800のポリペプチドであり、骨芽細

2

胞を活性化し、骨量を増加させて骨を強化するなど骨代謝において重要な役割を果たす因子であることが知られている。また、最近になって消化管にIGF-1のレセプターが存在することが明らかになり、経口摂取されたIGF-1が消化管のレセプターを介して作用することが示唆されている（ホルモンと臨床、第39巻、31〜37頁、1991年）。そして、このIGF-1については、ヒト乳中に存在することが確認されており（J. Clin. Endocrinol. Metab., 第58巻、955〜959頁、1984年）、それ以外にも血清や肝臓を含む全ての臓器に存在することが確認されている（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第81巻、935〜939頁、1984年）。

【0005】また、このIGF-1を調製する方法としては、血清などから単離する方法（J. Biol. Chem., 第261巻、569〜575頁、1986年）や遺伝子組み換えによって生産する方法（特開昭63-269984号公報）などが知られている。しかし、骨粗鬆症の予防や治療を目的として食品中にIGF-1を添加することを考えると、血清から単離したものや遺伝子組み換えで生産したものは、コストや安全性などの点で問題がある。

【0006】ところで、牛乳中にもIGF-1が存在することが確認されており、ウシIGF-1の化学構造はヒトIGF-1と全く同一であると報告されている（Biochem. J., 第251巻、95〜103頁、1988年）。これはウシIGF-1がヒトインスリン様増殖因子-1と同じ作用をもつことを示すものであり、牛乳中に存在するウシIGF-1であれば、食品中に添加しても安全上全く問題がないといえる。

【0007】なお、牛乳中からウシIGF-1を調製する方法としては、ウシ初乳を酸抽出した後、陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相HPLCなどを組み合わせて処理する方法が知られている（Biochem. J., 第233巻、207〜213頁、1986年）。しかし、實際上、この方法は工程が煩雑であり、特に、ウシ初乳の酸抽出を行うことにより乳蛋白質の大部分が酸沈殿し、この酸沈殿した乳蛋白質を有効に利用することができないので、工業的に好ましい方法とは言い難い。また、ウシIGF-1のN末端5残基が欠如したペプチドを牛乳中から単離する方法が知られている（特表昭63-501567号公報）。しかし、この方法も酸沈殿と陽イオン交換クロマトグラフィーなどによるものであり、同様に工業的に好ましい方法とは言い難い。

【0008】先に、本発明者らは、牛乳または牛乳由来の原料を加熱処理することにより、IGF-1を含有する組成物を調製する方法について提案した（特願平5-97273号）。しかしながら、このIGF-1含有組成物のIGF-1含量は10〜25μg/g程度であ

10

20

30

40

50

り、より IGF-1 含量の高い組成物を調製する方法の開発が望まれている。また、この方法においても、加熱によって沈澱する乳蛋白質を有効に利用することができないという問題もあった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、上述の問題点を鑑み、牛乳または牛乳由来の原料からウシ IGF-1 を分離する方法について、鋭意研究を進めたところ、陽イオン交換体を用いることにより、ウシ IGF-1 含量の高い組成物が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。したがって、本発明は、ヒト IGF-1 と同一の化学構造を持ち、骨強化作用や骨粗鬆症の予防や治療に有用であるウシ IGF-1 を高度に含有する組成物を牛乳から効率良く分離する方法を提供することを課題とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明では、ウシ IGF-1 を高度に含有する組成物を製造するに際して、牛乳または牛乳由来の原料を陽イオン交換体と接触させてウシ IGF-1 画分を吸着させた後、その画分を適当な溶出液で溶出し、回収する。

【0011】本発明で用いる牛乳または牛乳由来の原料とは、例えば、脱脂乳、チーズホエー、酸ホエー、初乳などであり、その他に、ホエー蛋白質濃縮物(WP C)、ホエー蛋白質単離物(WP I)、全粉乳、脱脂粉乳、ホエー粉などを還元したものでも構わない。また、陽イオン交換体と接触させる前に、これらの原料を予め加熱しておくことと良い。すなわち、原料を加熱して乳中に存在するカゼイン、 α -ラクトアルブミン、 β -ラクトグロブリンなどの主要な乳蛋白質を変性させることにより、陽イオン交換体に吸着する不純物の量を減少させることができる。その結果、組成物中のウシ IGF-1 含量を向上することになる。この加熱処理を行わなくてもウシ IGF-1 は十分回収できるが、カゼインやホエー蛋白質の混入が多くなり、結果的に組成物中の IGF-1 含量を低下させる。なお、この加熱処理を行うに際しては、次の式に従って加熱温度を設定すれば良い。

【0012】 $T \geq -5 (pH) + 100$

(但し、T は摂氏温度を表し、pH は $2 \leq pH \leq 7$ である。)

【0013】陽イオン交換体と接触させる原料の pH については特に限定は無いが、pH が低すぎると夾雑する乳蛋白質の多くが陽イオン交換体に吸着するため、結果的に組成物中のウシ IGF-1 含量が低下する。逆に pH が高すぎるとウシ IGF-1 の陽イオン交換体への吸着量が減少するので好ましくない。したがって、通常の牛乳の pH と同程度の中性域で陽イオン交換処理を行うと良い。

【0014】また、陽イオン交換体と接触させる原料の塩濃度についても特に限定は無いが、通常行われるイオ

ン交換処理と同様、原料の塩濃度が高いと陽イオン交換体への吸着が悪くなり、原料からのウシ IGF-1 回収率が低下する。したがって、通常の牛乳と同程度の塩濃度か、それ以下に調整しておくことが好ましい。

【0015】さらに、牛乳または牛乳由来の原料を陽イオン交換体と接触させる際には、予めクラリファイヤーなどで処理を行い、原料中に含まれる微細な沈澱などを除去しておくことが好ましい。

【0016】本発明では、牛乳または牛乳由来の原料と陽イオン交換体とを接触させる方法について特に制限はなく、従来より行われている充填層型カラムを用いる方法、回転型カラムを用いる方法、あるいはバッチ法などの方法に従って陽イオン交換を行うことができる。また、牛乳または牛乳由来の原料と陽イオン交換体との接触時間についても特に制限は無く、長時間接触させる方が良いが、余り長時間接触させると原料が劣化するので、接触時間は 10 分～24 時間とすることが望ましい。さらに、陽イオン交換体と接触させる原料の温度についても特に制限はないが、4℃～40℃が望ましい。温度が 40℃以上となると原料の劣化が著しくなる。

【0017】本発明では、陽イオン交換体と原料との割合を、陽イオン交換体/原料 = $1/10 (w/w) \sim 1/3, 000 (w/w)$ 、好ましくは、陽イオン交換体/原料 = $1/1.6 (w/w) \sim 1/1, 000 (w/w)$ とする。陽イオン交換体/原料の値が $1/10 (w/w)$ より大きくなると陽イオン交換体のコストが相対的に高くなる。また、陽イオン交換体/原料の値が $1/3, 000$ より小さくなるとウシ IGF-1 の回収率が極端に悪くなる。

【0018】本発明で用いることのできる陽イオン交換体としては、カルボキシメチル基を交換基として持つ CM-セルロファイン、CM-セルロース、マイクロブレップ CM ストロングカチオンエクスチェンジサポート、CM-セファロース、CM-セファデックス、C-スフェロシルなどやスルホン酸基を交換基として持つスルホン化キトバル、SP-トローバル、S-セファロース、SP-セファデックス、インディオ S3、S-スフェロシル、マイクロブレップ S ストロングカチオンエクスチェンジサポートなどを例示することができるが、ウシ IGF-1 含量のより高い組成物を得るためには、スルホン酸基を交換基として持つ強酸性陽イオン交換体を用いることが望ましい。

【0019】本発明では、牛乳または牛乳由来の原料と陽イオン交換体とを接触させて、陽イオン交換体にウシ IGF-1 を吸着させた後、まず、0.1 M 未満の塩濃度の溶液または脱イオン水などで陽イオン交換体を洗浄する。この洗浄を行うと夾雑する乳蛋白質の一部を陽イオン交換体から除去することができ、結果的に組成物中のウシ IGF-1 含量を向上させることができるので、この処理を行うことが好ましい。その後、陽イオン交換

体からウシIGF-1を溶出する。この溶出方法についても、通常行われている溶出方法に従って行えば良いが、溶出に用いる溶出液の塩濃度は0.1M~0.3Mの範囲のものを用いる必要がある。溶出液の塩濃度が0.1M未満であると陽イオン交換体からのウシIGF-1の溶出が十分行えない。また、溶出液の塩濃度が0.3Mを超えると陽イオン交換体に吸着したウシIGF-1以外の蛋白質をも一緒に溶出させることになり、結果的に組成物中のウシIGF-1含量を低下させる。

【0020】なお、この溶出液のpHについては5以上8未満が良好であることを実験により得ており、したがって、溶出液としては、トリス-塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、炭酸緩衝液など、通常用いられている緩衝液に、塩化ナトリウム、塩化カリウム、酢酸アンモニウムなどの中性の塩を溶解したものを用いると良い。また、溶出液として、塩濃度が0.1M以上0.3M以下で緩衝能を持たない中性の塩溶液を用いることもでき、操作性の向上やコストの低減という意味では好ましい。

【0021】次に、このようにして得られたウシIGF-1画分を含む溶出液については、通常行われている方法、例えば、イオン交換樹脂、逆浸透膜、限外濾過膜、透析膜、電気透析膜、ゲル濾過担体などを用いる方法により、あるいは、これらの方法を組み合わせた方法により、脱塩および濃縮を行うことができるが、脱塩および濃縮の方法としては、限外濾過およびダイヤフィルトレーションを組み合わせた方法が、濃縮と脱塩を同時に行えるので好ましい。なお、この際に用いることのできる限外濾過膜は、分画分子量が10kDa以下のものであればどのような限外濾過膜でも良い。このウシIGF-1含有組成物濃縮液をそのまま用いることもできるが、必要に応じて、噴霧乾燥や凍結乾燥などの方法によりウシIGF-1含有組成物の乾燥粉末を得ることもできる。さらに、ウシIGF-1は比較的熱に安定な性質を有するので、通常行われているような加熱殺菌の工程を加えることも可能である。

【0022】本発明の方法で得られたウシIGF-1含有組成物中のウシIGF-1含量を抗IGF-1抗体を用いた免疫学的測定法により測定したところ、原料からのIGF-1の回収率は平均40%程度であった。なお、初乳から酸抽出と陽イオン交換クロマトグラフィーを組み合わせて回収したウシIGF-1の回収率は、文献[Biochem. J., 第233巻, 207~213頁, 1986年]によると25%であり、本発明の方法はそれを上回るものであった。

【0023】また、本発明の方法によれば、陽イオン交換体に吸着しなかった乳成分を再利用することが可能であり、工程も煩雑でないので、酸抽出と陽イオン交換クロマトグラフィーを組み合わせた方法よりも実用的である。

【0024】なお、このウシIGF-1含有組成物中に

は、カゼインやホエイ蛋白質などの成分が含まれており、特に、ラクトフェリン、ラクトパーオキシダーゼ、セクレタリーコンポーネントなどの蛋白質が生理活性を有するが、これらの蛋白質は、ウシIGF-1の生理作用に何ら影響を与えるものではないので、これらの蛋白質が含まれていても実質的な問題はないが、不都合がある場合は、加熱などの処理によりこれらの蛋白質を失活させることもできる。また、ラクトパーオキシダーゼに関しては、再クロマトグラフィーなどの方法で分離するか、酸性状態にして失活させることも可能である。

【0025】本発明の方法によって得られたウシIGF-1含有組成物は、骨強化作用を有するので、飲食品、医薬、飼料などに添加し、骨粗鬆症の予防や治療などの効果を賦与することができる。また、このウシIGF-1含有組成物を含有する飲食品、医薬、飼料などに、塩化カルシウム、炭酸カルシウム、乳酸カルシウム、卵殻、あるいは乳由来のカルシウムなどの吸収性良好なカルシウムを添加することにより、これらの効果をさらに増すことが可能となる。なお、このウシIGF-1含有組成物については、ラットによる動物試験の結果、急性毒性は認められなかった。次に、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

【0026】

【実施例1】150℃、5秒間加熱殺菌したチーズホエー(pH6.0)50lを、脱イオン水で十分洗浄したスルホン化キトパール(富士紡績社製)500gを充填したカラムに、流速25ml/分で通液した。通液後、脱イオン水でスルホン化キトパールを十分洗浄した後、0.28M塩化ナトリウムを含む0.02M炭酸緩衝液(pH7.0)で吸着したウシIGF-1を溶出した。そして、この溶出液を分画分子量10kDaの限外濾過膜で脱塩、濃縮した後、凍結乾燥して粉末状のウシIGF-1含有組成物450mgを得た。このウシIGF-1含有組成物中に含まれるウシIGF-1の含量をラジオイムノアッセイ(RIA)で測定したところ、160μg/gであることが判った。

【0027】

【実施例2】未殺菌の脱脂乳(pH6.5)1,000lを、脱イオン水で十分洗浄したSPトローヤール(東ソー社製)1kgを充填したカラムに、流速30ml/分で通液した。通液後、脱イオン水でSPトローヤールを十分洗浄した後、0.15M塩化ナトリウムを含む0.05M炭酸緩衝液(pH7.5)で吸着したウシIGF-1を溶出した。そして、この溶出液を分画分子量8kDaの膜で限外濾過およびダイヤフィルトレーションを行って脱塩、濃縮した後、凍結乾燥して粉末状のIGF-1含有組成物50gを得た。このウシIGF-1含有組成物中に含まれるウシIGF-1の含量をラジオイムノアッセイ(RIA)で測定したところ、65μg/gであることが判った。

【0028】

【実施例3】10重量%濃度となるようホエー蛋白質濃縮物(WPC)を蒸留水で十分溶解してホエー蛋白質溶液(pH6.8)40lを調製した。このホエー蛋白質溶液を、脱イオン水で十分洗浄したCM-セルロファイン(生化学工業社製)400gを充填したカラムに、流速20ml/分で通液した。通液後、0.02M塩化ナトリウムを含む0.03Mリン酸緩衝液(pH7.4)でCM-セルロファインを十分洗浄した後、0.20M塩化ナトリウムを含む0.10Mクエン酸緩衝液(pH6.2)で吸着したウシIGF-1を溶出した。そして、この溶出液を電気透析(ED)法により脱塩、濃縮した後、凍結乾燥して粉末状のウシIGF-1含有組成物1.3gを得た。このウシIGF-1含有組成物中に含まれるウシIGF-1の含量をラジオイムノアッセイ(RIA)で測定したところ、35μg/gであることが判った。

【0029】

【実施例4】10重量%濃度になるようホエー蛋白質濃縮物(WPI)を蒸留水で十分溶解してホエー蛋白質溶液(pH6.5)80lを調製した。このホエー蛋白質溶液を、脱イオン水で十分洗浄したSP-セファロース(ファルマシア社製)800gを充填したカラムに、流速24ml/分で通液した。通液後、0.01M塩化ナトリウムを含む0.05M炭酸緩衝液(pH7.6)でSP-セファロースを十分洗浄した後、0.10M塩化ナトリウムを含む0.20Mクエン酸緩衝液(pH5.7)で吸着したウシIGF-1を溶出した。そして、この溶出液をイオン交換クロマトグラフィーにより脱塩した後、噴霧乾燥して粉末状のウシIGF-1含有組成物29.6gを得た。このウシIGF-1含有組成物中に含まれるウシIGF-1の含量をラジオイムノアッセイ(RIA)で測定したところ、51.2μg/gであることが判った。

【0030】

【実施例5】121℃、30秒間加熱殺菌した酸カゼインホエー3tを、重炭酸ナトリウムでpH6.0に調整した後、脱イオン水で十分洗浄したSP-セファデックス(ファルマシア社製)30kgを充填したカラムに、流速10l/分で通液した。通液後、脱イオン水でSP-セファデックスを十分洗浄した後、0.25M塩化ナトリウムを含む0.05M炭酸緩衝液(pH7.0)で吸着したウシIGF-1を溶出した。そして、この溶出液を逆浸透(RO)膜で脱塩、濃縮した後、噴霧乾燥して粉末状のウシIGF-1含有組成物176gを得た。このウシIGF-1含有組成物中に含まれるウシIGF-1の含量をラジオイムノアッセイ(RIA)で測定したところ、106μg/gであることが判った。

【0031】

【実施例6】10重量%濃度になるようホエー蛋白質濃

縮物(WPC)を蒸留水で十分溶解してホエー蛋白質溶液(pH6.8)を調製した後、この溶液を90℃で10分間加熱し、17,000×Gで遠心分離して得られた上清10lを、脱イオン水で十分洗浄したインディオンS3(オルガノ社製)500gを充填したカラムに、流速18ml/分で通液した。通液後、0.07Mトリス-塩酸緩衝液でインディオンS3を十分洗浄した後、0.3M塩化ナトリウム溶液(pH7.3)で吸着したウシIGF-1を溶出した。そして、この溶出液をゲル濾過クロマトグラフィーで脱塩した後、凍結乾燥して粉末状のウシIGF-1含有組成物1.4gを得た。このウシIGF-1含有組成物中に含まれるウシIGF-1の含量をラジオイムノアッセイ(RIA)で測定したところ、42μg/gであることが判った。

【0032】

【実施例7】150℃、5秒間加熱殺菌した初乳(pH6.8)2lを、脱イオン水で十分洗浄したS-スフェロシル(IBF社製)100gを充填したカラムに、流速20ml/分で通液した。通液後、脱イオン水でS-スフェロシルを十分洗浄した後、0.3M塩化ナトリウム溶液(pH7.3)で吸着したウシIGF-1を溶出した。そして、この溶出液を分画分子量10kDaの膜で限外濾過およびダイヤフィルトレーションを行って脱塩、濃縮した後、凍結乾燥して粉末状のウシIGF-1含有組成物1.5gを得た。このウシIGF-1含有組成物中に含まれるウシIGF-1の含量をラジオイムノアッセイ(RIA)で測定したところ、184μg/gであることが判った。

【0033】

【実施例8】121℃、30秒間加熱殺菌した脱脂乳(pH6.5)100lを、脱イオン水で十分洗浄したマイクロレップSストロングカチオンエクスチェンジサポート(バイオラッド社製)0.5kgを充填したカラムに、流速35ml/分で通液した。通液後、0.05M炭酸緩衝液でマイクロレップSストロングカチオンエクスチェンジサポートを十分洗浄した後、0.20M塩化ナトリウムを含む0.10Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.4)で吸着したウシIGF-1を溶出した。そして、その溶出液を逆浸透(RO)膜で脱塩、濃縮した後、噴霧乾燥して粉末状のウシIGF-1含有組成物1.3gを得た。このウシIGF-1含有組成物中に含まれるウシIGF-1の含量をラジオイムノアッセイ(RIA)で測定したところ、114μg/gであることが判った。

【0034】

【実施例9】未殺菌のチーズホエー(pH6.5)20lを、脱イオン水で十分洗浄したC-スフェロシル(IBF社製)300gを充填したカラムに、流速25ml/分で通液した。通液後、脱イオン水でC-スフェロシルを十分洗浄し、さらに、0.07Mリン酸緩衝液(pH

H7. 2) で十分洗浄した後、0. 25M塩化ナトリウムを含む0. 05Mクエン酸緩衝液(pH6. 5)で吸着したウシIGF-1を溶出した。そして、この溶出液をナノフィルトレーション膜で脱塩、濃縮した後、凍結乾燥して粉末状のウシIGF-1含有組成物890mgを得た。このウシIGF-1含有組成物中に含まれるウシIGF-1の含量をラジオイムノアッセイ(RIA)で測定したところ、43μg/gであることが判った。

【0035】

【試験例1】実施例1から9で得られたウシIGF-1含有組成物について、骨芽細胞増殖効果を調べた。培養骨芽細胞様株(MC3T3-E1)を96穴の平底細胞培養プレートに撒き込み、0. 3重量%ウシ血清を含むα-MEM培地(Flow Laboratories社製)で18時間培養した。なお、この培養に際しては、培地100μlに対して、ウシIGF-1含有組成物を0. 5重量%濃度に溶解した溶液2μlを添加した。培養後、トリチウムでラベルしたチミジンを添加し、2時間後に細胞に取り込まれたチミジンの放射活性を測定することにより、骨芽細胞の増殖活性を求めた。その結果を図1に示す。なお、図1では、培地にウシ*

*IGF-1含有組成物を添加しなかった群の放射活性を100%とし、放射活性からウシIGF-1含有組成物を添加した群の細胞増殖活性を示した。これによると、実施例1から9で得られたウシIGF-1含有組成物を添加した群は、ウシIGF-1含有組成物を添加しなかった群と比べ、1. 8~2. 7倍の骨芽細胞の増殖活性を示した。

【0036】

【試験例2】実施例5で得られたウシIGF-1含有組成物について、動物実験により骨強化作用を調べた。実験動物は4週齢のSD系雌ラットを用い、1試験群7匹で行った。骨粗鬆症モデルラットを1週間予備飼育した後、卵巣摘出手術を施し、さらに、カルシウム欠乏食で5週間飼育して実験に供した。また、疑似手術のみを施し、卵巣を摘出しない sham ラットも実験に供した。そして、骨粗鬆症モデルラットを対照群(A群)、ウシIGF-1含有組成物投与群(B)およびウシIGF-1含有組成物+カルシウム投与群(C)の3群に分け、表1に示す被験飼料でそれぞれ3週間飼育した。

【0037】

【表1】

	(A) 群	(B) 群	(C) 群
蔗糖	51.05 (%)	51.46 (%)	50.62 (%)
カゼイン	20.0	18.0	18.0
コーンスターチ	15.0	15.0	15.0
セルロース	5.0	5.0	5.0
コーン油	5.0	5.0	5.0
ビタミン混合	1.0	1.0	1.0
ミネラル混合	2.65	2.43	3.27
DL-メチオニン	0.3	0.3	0.3
ウシIGF-1含有組成物	-	1.81	1.81

【0038】なお、カゼイン2重量%に相当する窒素量に置換して、ウシIGF-1含有組成物1. 81重量%を添加した。また、飼料中のカルシウム量、リン量およびマグネシウム量については、飼料100g当たり、300mg、230mgおよび50mgとした。さらに、(C)群については、カルシウム量およびリン量を飼料100g当たり、520mgおよび400mgとした。

【0039】そして、3週間後に各群のラットの両側大腿骨を摘出し、破断特性装置で骨強度を測定した。その結果を図2に示す。これによると、大腿骨破断応力は、対照群(A)に比べてウシIGF-1含有組成物投与群(B)で統計学的に有意に高い値を示した。さらに、ウ*

※シIGF-1含有組成物+カルシウム投与群(C)は、ウシIGF-1含有組成物投与群(B)に比べて統計学的に有意に高い値を示した。

【0040】次に、本発明の方法で製造したウシIGF-1含有組成物を添加した飲食品について、参考例を示す。

【0041】

【参考例1】常法に従い、表2に示す組成のウシIGF-1含有組成物入り果汁飲料を製造した。

【0042】

【表2】

混合異性化糖	15.0 (重量%)
果汁	10.0
クエン酸	0.5

11

ウシIGF-1含有組成物	0.5
香料	0.1
カルシウム	0.1
水	73.5

12

【0043】

【参考例2】常法に従い、表3に示す組成のウシIGF-1含有組成物入りカルシウム剤を製造した。

*【0044】

【表3】

*

含水結晶ぶどう糖	73.5 (重量%)
ウシIGF-1含有組成物	20.0
カルシウム	5.0
シュガーエステル	1.0
香料	0.5

【0045】

【発明の効果】本発明の方法によると、牛乳または牛乳由来の原料からウシIGF-1を高濃度に含有するウシIGF-1組成物を提供することが可能となる。このウシIGF-1含有組成物は、骨強化作用を有することから、各種の骨関節疾患、特に骨粗鬆症の予防あるいは治療に有用である。また、ヒトの成長期にこのウシIGF-1組成物を摂取させることにより、最大骨量を増加させることができる。したがって、このウシIGF-1含※

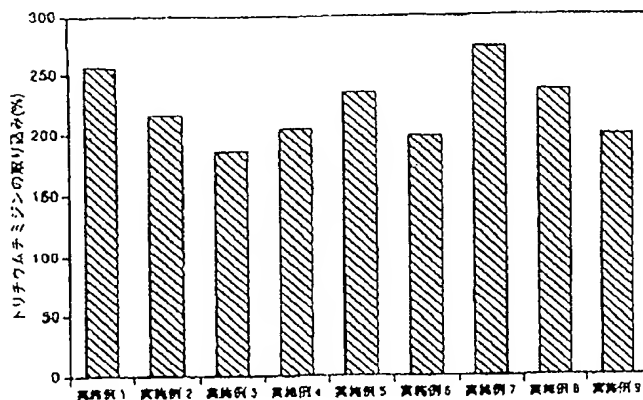
※有組成物は、飲食品、医薬、飼料などの素材として有用である。

【図面の簡単な説明】

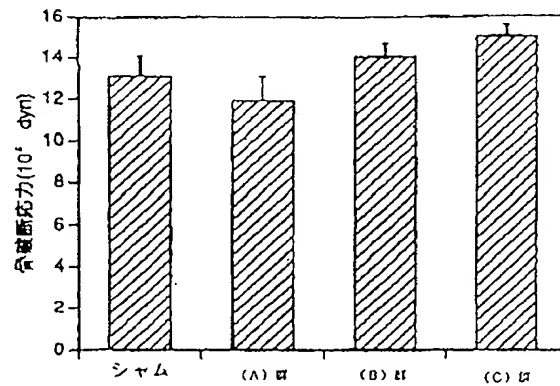
【図1】は、実施例1から9で得られたウシIGF-1含有組成物の骨芽細胞増殖促進効果について示したものである。

【図2】は、実施例5で得られたウシIGF-1含有組成物の骨強化作用について示したものである。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.*

A61K 38/27

識別記号

A D F

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(72)発明者 八尋 政利

東京都東村山市久米川町2-8-13